Rev. Soc. Entomol. Argent. 56 (1-4): 63-65, 1997

Viabilidad del acridicida *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora) luego de almacenamiento prolongado

LANGE, CARLOS E.
Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), calle 2 nro. 584, 1900 La Plata, Argentina.

☐ **ABSTRACT. Viability of the acridicide *Nosema locustae* (Protozoa: Microspora) after prolonged storage.** Specimens belonging to three different species of Melanoplinae grasshoppers, *Dichroplus elongatus, D. pratensis,* and *Baeacris punctulatus*, were utilized in experimental inoculations, following widely used protocols, to test the viability of spores of *Nosema locustae* that were previously stored as aqueous suspensions at -14 °C for 13 years. The obtained cumulative mortality and prevalence of infection in the survivors were consistent with the results of standarized bioassays reported by earlier workers, indicating that loss of viability did not occur. This remarkable storage capacity of *N. locustae* in the laboratory should be corroborated in the field. ☐

INTRODUCCIÓN

Nosema locustae Canning es un microsporidio patógeno de ortópteros utilizado para el control biológico microbiano de acridios (Orthoptera: Acrididae) (Henry & Oma, 1981). A pesar de que los estudios sobre otros patógenos (hongos, virus, protozoos) y sobre reguladores del crecimiento (IGR's) se hallan considerablemente avanzados (Krall & Wilps, 1994), *N. locustae* aún constituye la única alternativa disponible respecto de los insecticidas químicos tradicionales utilizados para el control de acridios plaga. *Nosema locustae* infecta principalmente el tejido adiposo, afectando así el metabolismo intermedio del huésped y compitiendo con éste por las reservas de energía. Entre otras anormalidades, causa aumento de mortalidad (Lockwood & Debrey, 1990), disminución de fecundidad (Ewen & Mukerji, 1980), retraso de crecimiento (Henry, 1969), reducción de actividad (letargo, lentitud, Bomar *et al.*, 1993) y disminución de consumo de alimento (Johnson & Pavlikova, 1986). Entre 1978 y 1982, durante distintos ensayos a campo, *N. locustae* fue introducido desde América del Norte en varias localidades de las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Chubut. Dichas introducciones resultaron en establecimiento (Lange, 1992; Lange & de Wysiecki, 1996), de modo que *N. locustae* opera como un factor adicional de regulación de la densidad de las poblaciones de varias especies de acridios argentinos.

La capacidad de tolerar un almacenamiento prolongado, entre otras propiedades, ha sido mencionada como una de las características más deseables en un agente microbiano de control (Henry, 1978). En el caso particular de los microsporidios, tal capacidad es aún de mayor importancia, pues su producción masiva es por el momento sólo factible *in vivo* (Brooks, 1988). Dicha característica restringe considerablemente los volúmenes de producción, limitante ésta que puede ser atenuada en cierta medida si el producto puede almacenarse en forma prolongada hasta su utilización.

La presente contribución tiene por objeto brindar información acerca de la viabilidad de los esporos de *N. locustae* a partir de su utilización en experiencias de laboratorio luego de ser almacenados por un período inusualmente prolongado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las experiencias realizadas consistieron en inoculaciones experimentales *per os*, siguiendo la técnica estandarizada del ofrecimiento de cebos de lechuga impregnados con cantidades conocidas de esporos a acridios separados individualmente en pequeños frascos (Henry & Oma, 1974; Henry *et al.*, 1985; Lange, 1987). Los acridios, nacidos de desoves obtenidos a campo o en bioterio, fueron tratados en el tercer estadio ninfal luego de ser sometidos a un ayuno de 24 horas. Una vez inoculadas, las ninfas fueron dispuestas en grupos de diez en tubos de acetato con extremos de alambre tejido (Henry, 1985) hasta su muerte, o sacrificio luego de 30 días, para el caso de los sobrevivientes. Fueron mantenidos en bioterios a 30 °C y 14 horas luz / 10 horas oscuridad, alimentándolos con lechuga, repollo, brotes de maíz o trigo y salvado de trigo. El número de acridios tratado y las dosis aplicadas figuran en la tabla I. Los acridios testigo, diez por dosis y especie, fueron tratados y

Tabla I. Inoculaciones experimentales con *N. locustae* sobre tres especies de acridios.

Huésped	Dosis (esporos/ninfa)	Nro. de insectos	Mortalidad* (%)	Infección en sobrevivientes luego de 30 días (%)
D. pratensis	$2{,}4 \times 10^5$	30	97	100
D. elongatus	$2{,}4 \times 10^4$	30	60	83
B. punctulatus	$1{,}0 \times 10^5$	30	70	78
B. punctulatus	$2{,}4 \times 10^4$	30	50	53

*Mortalidad acumulada luego de 30 días, corregida de acuerdo con la fórmula de Abbott (1925).

mantenidos de la misma forma, pero utilizándose agua destilada en lugar de la suspensión esporal para impregnar los cebos. La cantidad de esporos administrada por ninfa fue calculada con un hemocitómetro.

Tres especies de acridios fueron empleadas para las experiencias: *Dichroplus elongatus* Giglio-Tos, *D. pratensis* Bruner y *Baeacris punctulatus* (Thunberg), todas ellas pertenecientes a la subfamilia Melanoplinae y de comprobada susceptibilidad a *N. locustae* (Luna *et al.*, 1981; Lange & de Wysiecki, 1996).

Los esporos de *N. locustae* utilizados, producidos por Bio-Ecologics (Denver, Colorado, USA), fueron remanentes del producto empleado a comienzos de la década del ochenta en ensayos a campo realizados en la provincia de La Pampa y permanecieron congelados (-14 °C) por aproximadamente 13 años antes de realizarse las experiencias aquí presentadas.

Las diagnosis de las infecciones se realizaron mediante la observación de estados terminales del ciclo de desarrollo de *N. locustae* (esoroblastos, esporos) en homogenatos con agua destilada de cada insecto, examinados con microscopio de contraste de fases (X400), de acuerdo con lo descripto por Henry *et al.* (1973). Dado que suelen transcurrir unos 20 días desde el inicio de infección hasta la aparición de esporos (Onsager, 1988), los acridios muertos durante las tres primeras semanas después de inoculados no fueron examinados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de mortalidad acumulado a lo largo de las experiencias y la prevalencia de infección en los sobrevivientes luego de 30 días de inoculados figuran en la tabla I. El número limitado de insectos impidió realizar un mayor número de repeticiones. No obstante, dado que la finalidad primaria de las tareas no fue medir con exactitud la virulencia de *N. locustae* respecto de las especies de acridios utilizadas, sino conocer la capacidad infectiva (viabilidad) de los esporos luego de un almacenamiento inusualmente prolongado, no parece haber motivo para no considerar como válidos los datos obtenidos. Hubo una evidente mortalidad asociada a la presencia de *N. locustae*, al igual que un alto porcentaje de desarrollo de infección en los sobrevivientes. También, los sobrevivientes infectados mostraron anormalidades típicas asociadas a infecciones por *N. locustae*, a saber, retraso de crecimiento y letargo.

Estos resultados coinciden con la forma típica en que evolucionan las infecciones por *N. locustae* en bioensayos estandarizados sobre *Melanoplus sanguinipes* y *M. bivittatus* (Henry, 1978, 1990), especies neárticas de melanoplinos estrechamente relacionadas a las empleadas en las experiencias aquí presentadas (Vickery, 1989). Tal similitud sugiere que no parece haber ocurrido disminución apreciable alguna en la viabilidad de los esporos luego de 13 años de almacenamiento. Henry & Oma (1974) mencionan, aunque sin cuantificarla (%), "alguna pérdida de infectividad" luego de más de cinco años de almacenamiento a -10 °C. Prescindiendo de que ocurra o no una pequeña disminución de viabilidad al almacenar suspensiones de esporos de *N. locustae* por congelamiento, de la comparación con las longevidades conocidas para otras especies de microsporidios (Brooks, 1988), surge que *N. locustae* es una de las especies con mayor tolerancia en tal sentido.

Puesto que Henry & Oma (1974) observaron, en aplicaciones a campo sobre especies norteamericanas de acridios, que esporos de *N. locustae* almacenados a -10 °C desde ocho meses a tres años resultaron menos efectivos que esporos "frescos" (no más de cuatro meses de congelamiento), la extrema longevidad registrada en estas experiencias debería ser corroborada mediante experiencias en ambientes naturales. En tal sentido, parecería que los factores que normalmente reducen la estabilidad ambiental de los esporos microsporidianos, tales como las radiaciones solares, sequías y microorganismos del suelo (Maddox, 1977; Germida, 1984; Brooks, 1988), afectarían más a esporos almacenados por tiempos prolongados que a esporos "frescos".

BIBLIOGRAFÍA CITADA

ABBOTT, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.

BOMAR, CH. R., J. A. LOCKWOOD, M. A. POMERINKE & J. D. FRENCH. 1993. Multiyear evaluation of the effects of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) on rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) population density and natural biological controls. *Environ. Entomol.* 22(2): 489-497.

BROOKS, W. M.1988. Entomogenous Protozoa. *En:* Ignoffo, C. M. (ed.), Handbook of Natural Pesticides, vol.V, Microbial Insecticides, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-149.

EWEN, A. B. & M. K. MUKERJI. 1980. Evaluation of *Nosema locustae* (Microsporida) as a control agent of grasshopper populations in Saskatchewan. *J. Invertebr. Pathol.* 35: 295-303.

GERMIDA, J. J. 1984. Persistence of *Nosema locustae* spores in soil as determined by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 313-318.

HENRY, J. E. 1969. *Protozoan and viral pathogens of grasshoppers.* PhD thesis, Montana State University, Bozeman.

HENRY, J. E. 1978. Microbial control of grasshoppers with *Nosema locustae* Canning. *Misc. Publ. Ent. Soc. Am.* 11: 85-95.

HENRY, J. E. 1985. *Melanoplus* spp. *En:* Singh, P. & R. F. Moore (eds.), Handbook of insect rearing, vol. 1, Elsevier, Amsterdam, pp. 451-464.

HENRY, J. E. 1990. Control of insects by Protozoa. *En:* Baker, R. R. & P. E. Dunn (eds.), New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases, Alan R. Liss, Nueva York, pp. 161-176.

HENRY, J. E., J. L. FOWLER, M. C. WILSON & J. A. ONSAGER. 1985. Infection of West African grasshoppers with *Nosema locustae* Canning (Protozoa: Microsporida: Nosematidae). *Trop. Pest Manag.* 31(2): 144-147.

HENRY, J. E. & E. A. OMA. 1974. Effect of prolonged storage of spores on field applications of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) against grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.* 23: 371-377.

HENRY, J. E. & E. A. OMA. 1981. Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets. *En:* Burges, H. D. (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980, Academic Press, Nueva York, pp. 573-586.

HENRY, J. E., K. TIAHRT & E. A. OMA. 1973. Importance of timing, spore concentrations, and levels of spore carrier in applications of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) for control of grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 263-272.

JOHNSON, D. L. & E. PAVLIKOVA. 1986. Reduction of consumption by grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) infected with *Nosema locustae* Canning (Microsporida: Nosematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 48: 232-238.

KRALL, S. & H. WILPS. 1994. *New trends in locust control.* Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn.

LANGE, C.E. 1987. Encapsulación hemocitaria en *Gryllodes laplatae* (Orthoptera: Gryllidae) infectado por *Microsporidium* sp. (Protozoa: Microspora). *Neotropica* 33(89): 65-72.

LANGE, C. E. 1992. Espectro hospedador natural y persistencia de *Perezia dichroplusae* Lange y *Nosema locustae* Canning (Protozoa: Microspora) en acridios argentinos (Orthoptera: Acrididae). *Neotropica* 38(99): 65-74.

LANGE, C. E. & M. L. DE WYSIECKI. 1996. The fate of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) in Argentine grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *Biol. Control* 7(1): 24-29.

LOCKWOOD, J. A. & L. D. DEBREY. 1990. Direct and indirect effects of a large-scale application of *Nosema locustae* (Microsporida: Nosematidae) on rangeland grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). *J. Econ. Entomol.* 83(2): 377-383.

LUNA, G. C., J. E. HENRY & R. A. RONDEROS. 1981. Infecciones experimentales y naturales con protozoos patógenos en acridios de la República Argentina (Insecta: Orthoptera). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 40(1-4): 243-247.

MADDOX, J. V. 1977. Stability of entomopathogenic Protozoa. *Misc. Publ. Ent. Soc. Am.* 40: 243-247.

ONSAGER, J. A. 1988. Assessing effectiveness of *Nosema locustae* for grasshopper control. *Montana AgResearch* 5(3): 12-16.

VICKERY, V. R. 1989. The biogeography of Canadian Grylloptera and Orthoptera. *Can. Ent.* 121:389-424.

Recibido: 1-XI-1995
Aceptado: 13-III-1996